

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-284892

(43)Date of publication of application : 11.10.1994

(51)Int.Cl.

C12P 7/62
C08G 63/60

(21)Application number : 04-148686

(71)Applicant : DOI YOSHIHARU
NITTO DENKO CORP

(22)Date of filing : 14.05.1992

(72)Inventor : DOI YOSHIHARU
YOSHIDA YOSHITOKU

(54) PRODUCTION OF POLYESTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To easily and selectively produce a bio-degradable polyester by proliferating a microbial strain belonging to the genus *Pseudomonas* and capable of producing poly-3-hydroxybutyrate and accumulating the product while restricting either one of N, P and inorganic nutrients in the presence of a substrate.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to the genus *Pseudomonas* and capable of producing poly-3-hydroxybutyrate (e.g. *Pseudomonas acidovorans* IFO-13582) is proliferated by a pre-stage cultivation and then subjected to a post-stage cultivation in the presence of substrates selected respectively from 1propanol or 1-pentanol and 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol while restricting the amount of either one of nitrogen, phosphorus and inorganic nutrients. The polyester formed and accumulated in the microbial cell is separated to obtain the objective polyester having bio-degradability and containing one or more units such as 3-hydroxybutyrate unit, 3-hydroxyvalerate unit and 3-hydroxypropionate unit.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has Polly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of A and B which are shown below, respectively. A. 1-propanol or 1-pentanol B. 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit, The manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 3-hydroxy BARIETO unit and the 3-hydroxy propionate unit.

[Claim 2] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has Polly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of C and D which are shown below, respectively. C. 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol D. 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit, The manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 4-hydroxy butyrate unit and the 3-hydroxy propionate unit.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the manufacture approach of polyester. That purpose A 3-hydroxy butyrate unit (it is described as 3HB below), The polyester and the 3-hydroxy butyrate unit which consist of at least one or more units chosen from the 3-hydroxy BARIETO unit (it is described as 3HV below), and the 3-hydroxy propionate unit (it is described as 3HP below), it is in offer of the manufacture approach of polyester that practically useful polyester called the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 4-hydroxy butyrate unit (it is described as 4HB below) and the 3-hydroxy propionate unit can be manufactured easily.

[0002]

[Background of the Invention] Although the processing problem of a plastic waste has been aggravating on a scale of being worldwide, it considers as the new materials which can solve this problem smoothly, the "biodegradable plastic" generated by the microorganism attracts attention, and it is coming for the first time. Since full decomposition is promptly carried out by the microorganism of a nature and it is returned to the circulation cycle of an ecosystem by it, this "biodegradable plastic" attracts attention very much as a biopolymer from viewpoints, such as waste treatment, and a cyclical change of materials, environmental pollution. The Poly 3-hydroxy butyrate (henceforth PHB) accumulated into the fungus body of many microorganisms as energy storage matter was first found out as such a "biodegradable plastic." Although this PHB is a thermoplastic high polymer constituted by much 3HB connecting, since crystallinity was too high, it was inferior to shock resistance, and since it being a hard and weak ingredient and the production cost are high, utilization has been shelled.

[0003] Then, research is further advanced about this PHB, the polyester which consists of copolymerization components new one after another, such as polyester with which copolymerization of 3HV was carried out to the side chain with 3HB, polyester by 3HB and 4HB copolymerization, and also polyester which consists of 3HB, and 4HB and 3HV, is found out, and the industrial production by the fermenting method has come to be considered. In the copolymer which consists of for example, 3HB and 3HV, such polyester can show 50% or more of high crystallinity over the large presentation range of 0 - 95% of 3HV molar fractions, and can show the melting point of 70 - 178 °C with 3HV molar fraction. Moreover, it is known for the copolymer which consists of 3HB and 4HB by adjusting 4HB molar fraction that it will become possible to reduce degree of crystallinity, or A faecalis T1 although, as for what has low (5 - 28%) 4HB content, enzyme catabolic rate is quick in the enzyme resolvability using a dialytic ferment compared with the PHB homopolymer — 4HB content — being high (85 - 94%) — becoming late conversely is also found out. Furthermore, when becoming so quick that 4HB content becoming high in hydrolysis is found out and it makes a sustained-release drug, it is known by making 4HB content high that emission of a drug can be made quick. Thus, on the occasion of practical use, large selection of width of face is attained more by preparing suitably each molar fraction of 3HB, 4HB, and 3HV.

[0004]

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi.ejie

2006/06/23

[Description of the Prior Art] As the technique of manufacturing the Poly 3-hydroxy butyrate (PHB) using a microorganism, it stretches, nitrogen and the method of restricting and cultivating are used in the microorganism which has polyester productivity conventionally, and the technique which uses organic acids, such as a propionic acid or an isobutyric acid, as a carbon source is indicated by JP.57-150393A "a beta-hydroxy butyrate polymer and its manufacturing method" in the culture to which especially generation of polyester and are recording are urged. [0005] Moreover, the technique of manufacturing polyester with the rate of the copolymerization component to 3HB components, i.e., 4HB, and 3HV components comparatively high at JP.1-156320.A is indicated. This indication technique was a technique of manufacturing polyester as a carbon source in culture of this fungus body using a valeric acid and 4-hydroxybutyrate, using the *Alcaligenes bacillus*.

[0006] However, with the above mentioned technique of JP.57-150393A, only the copolymer which actually contains 3HV components of a maximum of 33 mol% in an example was shown, and it was not indicated at all about a copolymer with more rates of 3HV components than this. moreover, if 3HV components in a copolymer increase to 0-33mol %, it will get to know that a melting out temperature (Tm) falls rapidly from 180 °C to 85 degrees C with this increase — having — — — — — [— T. — it is suggested that it is difficult to obtain the product which has the same physical properties industrially from L.Bahn et al, Macromolecules, 19, 2871-2876(1986)], and this point. Moreover, since the organic acid was used for the quality of a culture medium of a microorganism in this indication technique, the technical problem that control of pH in the culture medium in a polyester are recording phase will become difficult also existed.

[0007] Like the indication technique of JP.57-150393A which, on the other hand, also described above the technique currently indicated in JP.1-156320.A, since organic acids, such as a valeric acid and 4-hydroxybutyrate, were used for the quality of a culture medium, the technical problem from which control of pH will become difficult existed. Moreover, in this technique, although the ratio of each component in polyester was indicated with 3HB component 10-90mol %, 4HB component 3-60mol %, and 3HV component 5-87mol %, a copolymer with more content of 4HB components than this was not shown at all. Furthermore, a valeric acid, 4-hydroxybutyrate, etc. which are used with this technique cannot come to hand easily, and the technical problem were not suitable also existed in practical use.

[0008] In the light of such the actual condition, this applicant applies for Japanese Patent Application No. No. 56725 [four to] "the manufacture approach of a polyester copolymer" previously. This technique was a technique using the specific diol (1,4-butanediol or 1,6-hexanediol) which is easy to come to hand industrially at the time of the culture which generates polyester and is stored up by the microorganism (pseudomonas), and specific alcohol (primary alcohol with odd carbon atoms other than a methanol) as a carbon source.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technique in which it had applied according to this above mentioned applicant was the outstanding manufacture approach which can make the comparatively (mole ratio) large copolymer of 4HB components generate in a copolymer with 3HB, 4HB, and 3HV while being able to perform pH control easily. However, in the industry, the denaturation copolymer of the copolymer which consists of the above mentioned 3HB, 4HB, and 3HV, i.e., the copolymer which 3HP component newly contained, could control high-melting and catabolic rate broadly, and its attention came to be paid in the point that it can become a industrial more practical ingredient, and creation of the manufacture approach which can also manufacture the copolymer containing this 3HP component easily was desired further.

[0010]

[Means for Solving the Problem] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has Poly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium in this invention, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of A and B which are shown below, respectively. A, 1-propanol or 1-pentanol B, 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol 3-hydroxy

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi.ejie

2006/06/23

butyrate unit, A 3-hydroxy BARIETO unit. The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has the manufacture approach of polyester and Poly 3-hydroxy butyrate productivity which are characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from 3-hydroxy propionate units within a culture medium. Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of C and D which are shown below, respectively. C, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, or 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit. Said conventional technical problem is entirely canceled by offering the manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 4-hydroxy butyrate unit and the 3-hydroxy propionate unit.

[0011]

[Elements of the Invention] Hereafter, the configuration of the manufacture approach of the polyester concerning this invention is explained. In this invention, a specific pseudomonad is used as a microorganism which has PHB productivity. As this pseudomonad, *Pseudomonas* test SUTERONI (*Pseudomonas testosteroni*), *Pseudomonas* DERAIRUDI (*Pseudomonas delafieldii*), *Pseudomonas* SEPASHIA (*Pseudomonas cepacia*) And the mutant of such strain etc. is used suitably. It is especially *Pseudomonas* acidovorans (*Pseudomonas acidovorans*). It is the most desirable and *Pseudomonas* acidovorans IFO-13582 and ATCC-15688 are more preferably used by experimental learning especially.

[0012] These microorganisms are cultivated in two steps with culture of the latter part which any one of culture of the preceding paragraph which proliferates a fungus body in a culture medium with abundant nutrients first, and the indispensable components of growth of fungus bodies, such as nitrogen, Lynn, or various mineral nutrients, is restricted [latter part], and generates and stores up polyester into a fungus body. Thus, by being under culture, excluding any one of the growth indispensable components, such as nitrogen, at all, and making a growth indispensable component drained, growth of a fungus body is restricted and polyester can be compounded efficiently. As this cultivation, any of the batch process approach or continuous culture may be used, and especially limitation is not carried out. Especially limitation is not carried out about the cultivation of the preceding paragraph, but a fungus body is proliferated according to a conventional method. Filtration or centrifugal separation separates with culture medium, and the fungus body proliferated by culture of this preceding paragraph shifts to latter culture. Or after at least one of components indispensable to the growth in a culture medium is consumed in the process in which a fungus body is increased in culture of the preceding paragraph, you may shift to the latter part. Under the present circumstances, as an indispensable component of growth, rather than mineral nutrients, such as a potassium and magnesium, although it is more suitable for generation of polyester, and are recording to restrict nitrogen or Lynn, especially limitation is not carried out in this invention.

[0013] As a culture-medium component, although the natural product of synthetic carbon sources, such as saccharides, such as a glucose, fructose, and a mannose, a methanol, ethanol, an acetic acid, and butanoic acid, a yeast extract, a peptone, a meat extract, etc. is illustrated as a suitable example as a carbon source, especially limitation is not carried out. Moreover, as a nitrogen source, organic nitrogen compounds, such as inorganic nitrogen compounds, such as ammonia, ammonium salt, and a nitrate, a peptone, a yeast extract, and a meat extract, etc. are illustrated suitably. Phosphate is given as a source of Lynn and the cation of the mineral salt of a potassium, magnesium, calcium, iron, manganese, cobalt, zinc, copper, etc. is further given suitably as a mineral nutrient.

[0014] As this culture condition, both the preceding paragraph and the latter part are temperature, respectively. It cultivates aerobically within the limits of 20 - 40 °C extent and about six to ten pH.

[0015] In culture of the latter part which generates polyester and is stored up into a fungus body, (A) 1-propanol or 1-pentanol and (B) 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol is used as a

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi.ejie

2006/06/23

substrate especially by this invention. This is based on experimental learning that the polyester which consists of at least one or more units chosen from 3HB units, 3HV units, and 3HP unit can be generated and accumulated alternatively while it can perform pH control easily by using these substrates, as a result of this artificer's examining wholeheartedly the manufacturing method of the polyester which consists of 3HB units, 3HV units, and a 3HP unit using a pseudomonad.

[0016] Or in addition to the polyester which consists of the above mentioned 3HB, 3HV, and one or more units chosen from 3HP, when making the polyester which consists of 3HB, 4HB, and one or more units chosen from 3HP, generate, in latter culture, (C) 1,4-butanediol or 1,6-hexanediol and (D) 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol is used as a substrate. This can make the polyester which consists of at least one or more units chosen from 3HB, 4HB, and 3HP, unit generate efficiently alternatively by using such a substrate based on this artificer's experimental learning by research wholeheartedly.

[0017] Although the concentration in the culture medium of these substrates will not be limited especially if it is an amount which can be made to generate polyester and does not check training of a microorganism, it is desirable that carbon source concentration which totaled the carbon source concentration, (C) 1,4-butanediol or the 1,6-hexanediol and (D) 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol which totaled (A) 1-propanol or 1-pentanol and (B) 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol is made into within the limits of about 0.05 - 3.0 % extent.

[0018] These substrates may be given in several steps that a part should just be used although to use continuously during latter culture is more desirable, and especially limitation is not carried out. Moreover, although only these substrates may be used by latter culture, the carbon source in which utilization is possible, and a desirable carbon source with easy pH control of fructose other than an acid (for example, a glucose), a methanol, ethanol, etc. can also be mixed.

[0019] Filtration or centrifugal separation separates a fungus body from culture medium after culture termination, and the polyester which consists of the polyester which consists of the 3HB accumulated into the fungus body, 3HV, and at least one or more units chosen from 3HP, or 3HB, 4HB, and at least one or more units chosen from 3HP, is extracted. Especially limitation cannot be carried out as this extract approach, for example, a solvent like chloroform can extract, and it can obtain easily by setting this extract with poor solvents, such as a hexane.

[0020]

[Example] The manufacture approach of the polyester which gives an example and is hereafter applied to this invention, and its effectiveness are further explained to a detail.

[0021] (Example 1) *Pseudomonas* acidovorans (*Pseudomonas acidovorans*) — IFO-13582 It used and polyester was manufactured. First, it is the poly peptone in 1l. of distilled water. 10g yeast extract 10g, 2(NH4) SO4 5g, and 5g of meat extracts were mixed, culture medium was prepared, in this culture medium, 28 degrees C of fungus bodies were cultivated for 48 hours, the fungus body was proliferated, and preceding paragraph culture was performed.

[0022] Centrifugal separation separated the fungus body after preceding paragraph culture termination. Culture medium was prepared according to the following formula, using 1-pentanol and 1,5-pentanediol as mineral nutrients, such as Lynn, magnesium, and a trace element, and a carbon source. It is pH7.0 about this culture medium. After preparing, the separated fungus body was shifted to this culture medium. This culture medium performed latter-part culture at 28 degrees C for 96 hours, and generation within the fungus body of polyester and are recording were performed.

(Inside of 1l. of distilled water)

K2HPO4 5.8g MgSO4 0.12g KH2PO4 3.7g 1-pentanol 1.0g trace element 1ml 1,5-pentanediol 4.0g A trace element solution contains the following mineral nutrient in 1-N hydrochloric acid. FeSO4.7H2O 2.78g CaCl2.2H2O 1.67g MnCl2.4H2O 1.88g CuCl2.2H2O 0.17g CoSO4.7H2O 2.81g ZnSO4.7H2O Centrifugal separation separated the fungus body from culture medium after 0.29g culture termination, and chloroform extracted, after washing in cold water. The extract was once condensed and the polyester which added the hexane to this concentration liquid and was obtained was settled. Precipitate was collected, it dried and polyester was obtained.

[0023] Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) analysis was presented with

http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi.ejie

2006/06/23

the obtained polyester. $^1\text{H-NMR}$ (100MHz) analysis It measures at a room temperature using JEOL FX-100, and is CDCl_3 . A solvent and 15 microseconds Pulse width (45-degree pulse include angle), pulse repetition-time:5 seconds, and 8K data point It carried out on conditions. In addition, TMS was used as a standard reagent.

[0024] The sigma value (ppm) of said 1 H-NMR (100MHz) analysis [1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group)], [0.82-0.98 (methyl group), 2.33-2.58 (the 1st methylene group), 1.50-1.70 (the 2nd methylene group), 5.03-5.34 (methine group)], [2.33-2.58 (the 1st methylene group), and 4.27-4.39 (the 2nd methylene group)] it was identified 3HB, 3HV, and 3HP, from it having been, respectively. This result is shown in drawing 1.

[0025] (Examples 2-5) The polyester of an example 1 and the same examples 2-5 was obtained except having prepared at a mixed rate that 1-pentanol and 1,5-pentanediol are shown in Table 1 as a carbon source in latter-part culture.

[0026]
[Table 1]

[illegible]

(單位：日)

[0027] (Examples 5-10) The polyester of an example 1 and the same examples 6-10 was obtained except having prepared at a mixed rate that 1,4-butanediol and 1,5-pentanediol are shown in Table 1 as a carbon source in latter culture. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1-H-NMR (100MHz) and 13 C-NMR (125 MHz) analysis were presented with the polyester obtained in the example 6 on the same conditions as an example 1. 13 C-NMR (125 MHz) analysis is JEOL GX-100. It uses, and measures at 27 degrees C. and they are CDCL3 and 5.5 milliseconds. Pulse width (45-degree pulse include angle) and pulse repetition time: It can be on condition that 64Kdata point for 5 seconds. In addition, TMS was used as a standard reagent.

[0028] In the example 6, the sigma value (ppm) of ¹H-NMR (100MHz) analysis (1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methylene group), [2.33-2.58 (the 1st methylene group) and 2.18-2.09 (the 2nd methylene group), 4.06-4.18 (3rd methylene group), [2.33-2.58 (the 1st methylene group), and 4.27-4.39 (the 2nd methylene group) it was identified 3HB, 4HB, and 3HP. from it having been, respectively. This result is shown in drawing 2.

[0029] moreover, the sigma value (ppm) of ¹³C-NMR (125 MHz) analysis : 189.83 to 3HP, 3HB was identified for 170.04 to 3HB ↔ 4HB, and 169.14 to 3HB ↔ 3HB was identified [172.62 to 4HB ↔ 4HB / 171.85 to 4HB ↔ 3HB] for 3HB ↔ 3HP, from 189.88, respectively. This result is shown in drawing 3.

[0030] (Example 1 of a comparison) In latter-part culture, the same polyester as an example 1 was obtained except having used only 5.0g only of 1-pentanol, and the said table 1 as a carbon source. Proton-magnetic-resonance spectrum of ¹H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same conditions as an example 1. It was identified 3.3B and 3HV, respectively from this signal value (ppm) having chemical shift 1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methylene group), and 0.82-0.96 (methyl group), 1.50-1.70 (the 1st methylene group), 2.33-2.58 (the 2nd methylene group) and 5.03-5.34 (methyl group). This result is shown in drawing 4.

[0031] (Example 2 of a comparison) In latter-part culture, the same polyester as an example 1 was obtained except having used only 5.0g only of 1,4-butanediol, as shown in Table 1 as a carbon source. Proton-magnetic-resonance-spectrum (1H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same condition as an example 1. It was identified 3HB and 4HB, respectively from this signal value (ppm) of this having been 1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group), and 4.06-4.18 (the 1st methylene group), 1.78-2.09 (the 2nd methylene group) and 2.33-2.58] (the 3rd methylene group). This result is shown in drawing 5.

[0032] (Example 3 of a comparison) As Alcaligenes you TOROFASU ATCC 17699 is used instead of Pseudomonas acidovorans as a fungus body and it is shown in Table 1 as a carbon source of latter-part culture, they are 17g of 4-hydroxybutyrate, and 3g of valeric acids. Polyester was obtained like the example 1 except having used. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same conditions as an example 1. This signal value (ppm) [1.24-1.30 (methyl group) and 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group), [0.82-0.98 (methyl group), 1.50-1.70 (the 1st methylene group) and 2.33-2.58 (the 2nd methylene group)]. It was identified 3HB, 3HV, and 4HB, respectively from this having been 5.03-5.34 (methine group), and [4.06-4.18 (the 1st methylene group), 1.78-2.09 (the 2nd methylene group) and 2.33-2.58] (the 3rd methylene group). This result is shown in drawing 6.

[0033]

[Test Example(s)] Each presentation ratio was calculated using the polyester obtained in examples 1-10 and the examples 1-3 of a comparison from the integral value of proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz). Moreover, the melting point (Tm) DSC measurement determined. This result is shown in Table 2.

[0034]

[Table 2]

[illegible]

[0035]

[Effect of the Invention] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad in which this invention has Poly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium as explained in full detail above, Restrict any one of nitrogen, Lymn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of A and B which are shown below, respectively. A. 1-propanol or 1-pentanol B. 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit, A 3-hydroxy BARRETO unit, The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has the

manufacture approach copolyester and Poly 3-hydroxy butyrate productivity which are characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from 3-hydroxy propionate units within a culture medium, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fermenter. In the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by the sub-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate channel D, 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit. Since it is the manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units out of a 4-hydroxy butyrate unit and 3-hydroxy propionate unit. The outstanding effectiveness that ***** can perform also manufacture the high copolymer of utility value alternatively and very easily industrially is done so.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 1.

[Drawing 2] It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 6.

[Drawing 3] They are the same as the above and 13 C-NMR (125 MHz) spectrum Fig.

[Drawing 4] It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 1 of a comparison.

[Drawing 5] It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 2 of a comparison.

[Drawing 6] It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 3 of a comparison.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-284892

(43)公開日 平成6年(1994)10月11日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12P 7/62		7432-4B		
C08G 63/60	NPS	7107-4J		

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全9頁)

(21)出願番号 特願平4-148686

(22)出願日 平成4年(1992)5月14日

(71)出願人 591055012

土肥 義治

神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

(71)出願人 000003964

日東電工株式会社

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

(72)発明者 土肥 義治

神奈川県横浜市旭区今宿町2617番地の39

(72)発明者 吉田 良徳

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東
電工株式会社内

(74)代理人 弁理士 清原 義博

(54)【発明の名称】 ポリエステルの製造方法

(57)【要約】

【構成】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を、培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させる。この二段培養において、特に後段培養を(A)1-プロパノール又は1-ペンタノール及び(B)1,3-プロパンジオール又は1,5-ペンタジオールの存在下で行い、3-ヒドロキシブチレート単位(3HB)、3-ヒドロキシバレレート単位(3HV)、3-ヒドロキシプロピオネート単位(3HP)の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを製造する。

【効果】 3HB、3HV、3HPの中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的に容易に製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリー3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュドモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステル

の製造方法であって、前記後段の培養を次に示すA及びBの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

A. 1-プロパノールまたは1-ペンタノール

B. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項2】 ポリー3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュドモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール

D. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明はポリエステルの製造方法に係り、その目的は3-ヒドロキシブチレート単位（以下3HBと記す）、3-ヒドロキシバリレート単位（以下3HVと記す）、3-ヒドロキシプロピオネート単位（以下3HPと記す）の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステル及び3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位（以下4HBと記す）、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルといった実用上有用なポリエステルの容易に製造することのできるポリエステルの製造方法の提供にある。

【0002】

【発明の背景】プラスチック廃棄物の処理問題が世界的な規模で深刻化してきているが、この問題を円滑に解消できる新素材として、微生物によって生成される「生分解性プラスチック」が注目されはじめてきている。この「生分解性プラスチック」は自然界の微生物によって速

やかに完全分解され、生態系の循環サイクルに還元されるため、廃棄物処理や物質循環、環境汚染等の観点から、バイオポリマーとして非常に注目されている。このような「生分解性プラスチック」として最初に見出されたのは、エネルギー貯蔵物質として多くの微生物の菌体内に蓄積されているポリ3-ヒドロキシブチレート（以下、PHBという）であった。このPHBは3HBが多数連結して構成される熱可塑性の高分子物質であるが、結晶性が高すぎるために耐衝撃性に劣り、硬くて脆い材料であること、及び生産コストが高いことなどから実用化が見送られてきた。

【0003】そこで、このPHBについてさらに研究が進められ、3HBとともに側鎖に3HVが共重合されたポリエステルや3HBと4HBとの共重合によるポリエステル、更には3HBと4HB・3HVからなるポリエステルなど、次々と新しい共重合成分からなるポリエステルが見出され、醗酵法による工業的な生産が検討されてくるようになってきた。このようなポリエステルは、例えば3HBと3HVからなる共重合体では、3HV分率0～95%の広い組成範囲にわたり50%以上の高い結晶性を示し、3HV分率によって70～178℃の融点を示すことができる。また、3HBと4HBからなる共重合体では4HB分率を調整することにより結晶化度を低下させることが可能となることが知られている。あるいは、*A. faecalis* T₁ の醗酵酵素を用いた酵素分解性においては、4HB含有率の低い（6～28%）ものはPHBホモポリマーに比べて酵素分解速度が速くなっているが、4HB含有率が高い（85～94%）と逆に遅くなることも見出されている。さらに、加水分解においては4HB含有率が高くなる程速くなることが見出され、徐放性の薬物を作る場合には4HB含有率を高くすることによって薬物の放出を速くできることが知られてきた。このように3HB、4HB、3HVの各分率を適宜調製することにより、実用に際してより幅の広い選択が可能となる。

【0004】

【従来の技術】微生物を用いたポリ3-ヒドロキシブチレート（PHB）を製造する手法としては、従来よりポリエステル生産能を有する微生物を窒素又はりんを制限して培養する方法が使用されており、特にポリエステルの生成、蓄積を促す培養において、プロピオン酸あるいはイソ酪酸等の有機酸を炭素源として使用する技術が特開昭57-150393号公報「β-ヒドロキシブチレート重合体およびその製造法」にて開示されている。

【0005】また、特開平1-156320号公報にて3HB成分に対する共重合成分、すなわち4HB及び3HV成分の割合が比較的高いポリエステルの製造する技術が開示されている。この開示技術はアルカリゲネス属菌を用い、且つこの菌体の培養において、例えば吉草酸および4-ヒドロキシ酪酸を炭素源として使用してポリエステ

ルを製造する技術であった。

【0006】しかしながら、前記した特開昭57-150393号公報の技術では、実際に実施例においては最高33mol%の3HV成分を含む共重合体しか示されておらず、3HV成分の割合がこれより多い共重合体については何ら開示されていなかった。また、共重合体中の3HV成分が0-33mol%まで増大すると、この増大に伴って融解温度(T_m)が180℃から85℃まで急激に低下することが知られており[T.L.Bluhm et al, Macromolecules, 19, 2871-2876(1986)]、この点から工業的に同一の物性を持つ製品を得ることが困難であることが示唆される。また、この開示技術においては微生物の培養基質に有機酸を使用しているために、ポリエステル蓄積段階における培養液中のpHの制御が困難なものとなるという課題も存在した。

【0007】一方、特開平1-156320号公報にて開示されている技術も前記した特開昭57-150393号公報の開示技術と同様、培養基質に吉草酸や4-ヒドロキシ酪酸等の有機酸が使用されているためpHの制御が困難なものとなる課題が存在した。またこの技術においては、ポリエステル中の各成分の比率が3HB成分10-90mol%、4HB成分3-60mol%、3HV成分5-87mol%と開示されているが、4HB成分の含有がこれよりも多い共重合体については何ら示されていなかった。さらに、この技術にて使用される吉草酸や4-ヒドロキシ酪酸等は容易に入手できるものではなく、実用には適していないという課題も存在した。

【0008】このような実情に照らし、この出願人らによって特願平4-56725号「ポリエステル共重合体の製造方法」が先に出願されている。この技術は、微生物(シュードモナス属菌)によりポリエステルの生成、蓄積させる培養時に、工業的に入手しやすい特定のジオール

(1,4-ブタンジオール又は1,6-ヘキサンジオール)と特定のアルコール(メタノール以外の奇数個の炭素原子をもつ第一級アルコール)を炭素源として用いる技術であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】前記したこの出願人らによる既出願の技術は、pH制御を容易に行うことができるとともに、3HB、4HB、3HVとの共重合体において4HB成分の割合(モル比)が大きい共重合体を生成させることのできる優れた製造方法であった。しかしながら、業界では前記した3HB、4HB、3HVからなる共重合体の変性共重合体、すなわち新たに3HP成分が含有された共重合体が、高融点及び分解速度を幅広く制御でき、工業的により実用的な材料となりうるという点において着目されるようになり、この3HP成分を含有した共重合体をも容易に製造できる製造方法の創出がさらに望まれていた。

【0010】

【課題を解決するための手段】この発明では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すA及びBの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

A. 1-プロパノールまたは1-ペンタノール

10 B. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法及びポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルの生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール

D. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法を提供することにより前記従来の課題を悉く解消する。

【0011】

【発明の構成】以下、この発明に係るポリエステルの製造方法の構成について説明する。この発明ではPHB生産能を有する微生物として特定シュードモナス属菌を使用する。このシュードモナス属菌としては、シュードモナス・テストステロニ(*Pseudomonas testosteroni*)、シュードモナス・デラフィールディ(*Pseudomonas delafieldii*)、シュードモナス・セバシア(*Pseudomonas cepacia*)及びこれらの菌株の突然変異株等が好適に使用され、特にシュードモナス・アシドボランス(*Pseudomonas acidovorans*)が実験的知得により最も好ましく、なかでもシュードモナス・アシドボランスIFO-13582, ATCC-15668がより好ましく使用される。

【0012】これらの微生物は、まず栄養豊富な培地において菌体を増殖させる前段の培養と、窒素、リンあるいは各種無機栄養素といった菌体の成長の必須成分のうちのいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルの生成、蓄積させる後段の培養との2段階にて培養される。

50 このように窒素等の成長必須成分のいずれか一つを全く

含まないか、若しくは培養中で成長必須成分を枯渇させることにより、菌体の成長が制限され、ポリエステル合成が効率良く行なえる。この培養法としては、回分式方法あるいは連続培養のいずれを用いてもよく、特に限定はされない。前段の培養法については特に限定はされず常法に従って菌体を増殖させる。この前段の培養により増殖させた菌体は、濾過あるいは遠心分離などにより培養液と分離し、後段の培養へと移行される。或いは、前段の培養において菌体を増殖する過程で、培地中の成長に必須の成分のうちの少なくとも1つが消費された後に後段へ移行してもよい。この際、成長の必須成分としてはカリウムやマグネシウムなどの無機栄養素よりも、窒素若しくはリンを制限した方がポリエステルの生成、蓄積には好適であるがこの発明においては特に限定はされない。

【0013】培地成分としては、炭素源としてグルコース、フラクトース、マンノースなどの糖類、メタノール、エタノール、酢酸、酪酸などの合成炭素源、酵母エキス、ペプトン、肉エキスなどの天然物等が好適な実施例として例示されるが特に限定はされない。また、窒素源としてはアンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素化合物等が好適に例示される。リン源としてはリン酸塩が、さらに無機栄養素としてはカリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛、銅などの無機塩の陽イオンが好適に与えられる。

【0014】この培養条件としては、前段および後段のいずれもそれぞれ温度 20 ~ 40 °C 程度、pH 6 ~ 10 程度の範囲内において好氣的に培養する。

【0015】菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段の培養において、この発明では特に基質として、

(A) 1-プロパノール又は1-ペンタノール及び
(B) 1, 3-プロパンジオール又は1, 5-ペンタンジオールが使用される。これは、この発明者らがシュードモナス属菌を用い、3HB単位、3HV単位、3HP単位からなるポリエステルの製造法について鋭意検討した結果、これら基質を用いることによって、pH制御が容易に行なえるとともに、3HB単位、3HV単位、3HP単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的に生成、蓄積できるとの実験的知得に基づくものである。

【0016】あるいは、前記した3HB、3HV、3HPの中から選択された一以上の単位からなるポリエステル以外に、3HB、4HB、3HPの中から選択された一以上の単位からなるポリエステルを生成させる場合には、後段の培養において基質として(C) 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール及び(D) 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオールが使用される。これはこの発明者らの鋭意研究による実験的知得に基づくもので、このような基質を用いる

ことにより、3HB、4HB、3HP単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的に効率良く生成させることができる。

【0017】これらの基質の培養液中の濃度は、ポリエステルを生成させることができ、且つ微生物の育成を阻害しない量であれば特に限定されることはないが、

(A) 1-プロパノール又は1-ペンタノール及び

(B) 1, 3-プロパンジオール又は1, 5-ペンタンジオールを合計した炭素源濃度または(C) 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール及び

(D) 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオールを合計した炭素源濃度が、約0.05~3.0%程度の範囲内とされるのが好ましい。

【0018】これらの基質は、後段の培養中に連続で用いた方が好ましいが、一部分でも用いられればよく、また数回に分けて与えてもよく、特に限定はされない。また、後段の培養でこれらの基質のみを用いてもよいが、資化可能な炭素源、好ましくは酸以外の、例えばグルコース、フラクトース、メタノール、エタノール等のpH制御が容易な炭素源を混合させることもできる。

【0019】培養終了後、濾過あるいは遠心分離などにより培養液から菌体を分離し、菌体内に蓄積された3HB、3HV、3HPの中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステル又は3HB、4HB、3HPの中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルの抽出する。この抽出方法としては特に限定はされず、例えばクロロホルムのような溶剤で抽出し、この抽出液をヘキサンなどの貧溶媒で沈殿させることによって容易に得ることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例を挙げてこの発明に係るポリエステルの製造方法及びその効果をより一層詳細に説明する。

【0021】(実施例1) シュードモナス・アシドボランズ(*Pseudomonas acidovorans*) IFO-13582を用いてポリエステルを製造した。まず、蒸留水1リットル中にポリペプトン 10g、酵母抽出物 10g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g、肉エキス5gを混合して培養液を調製し、この培養液中で菌体を26°C、48時間培養して菌体を増殖させ、前段培養を行った。

【0022】前段培養終了後、遠心分離により菌体を分離した。リン、マグネシウム、微量元素等の無機栄養素、及び炭素源として1-ペンタノール、1, 5-ペンタンジオールを用い、下記の処方に従って培養液を調製した。この培養液をpH7.0に調製した後、分離された菌体をこの培養液に移行した。この培養液にて26°Cで96時間後段培養を行い、ポリエステルの菌体内での生成、蓄積を行った。

(蒸留水1リットル中)

K_2HPO_4 5.8g MgSO_4

0.12g

KH₂PO₄ 3.7g 1-ペンタノール 1.0g
 ※微量元素 1ml 1, 5-ペンタンジオール 4.0g

※ 微量元素溶液とは、1N塩酸中に下記の無機栄養素を含むものである。

FeSO₄·7H₂O 2.78g CaCl₂·2H₂O 1.67g
 MnCl₂·4H₂O 1.98g CuCl₂·2H₂O 0.17g
 CoSO₄·7H₂O 2.81g ZnSO₄·7H₂O 0.29g

培養終了後、遠心分離により菌体を培養液から分離し、水洗いした後クロロホルムで抽出した。抽出液をいったん濃縮し、この濃縮液にヘキサンを加えて、得られたポリエステルを沈殿させた。沈殿物を回収し、乾燥してポリエステルを得た。

【0023】得られたポリエステルはプロトン磁気共鳴スペクトル¹H-NMR(100MHz)分析に供した。¹H-NMR(100MHz)分析は JEOL FX-100を用いて室温で測定し、CDCl₃ 溶媒、15μs パルス幅(45° パルス角度)、*

* パルス繰り返し時間: 5秒、8K data point の条件にて行った。尚、標準試薬としてはTMSを用いた。

【0024】前記¹H-NMR(100MHz)分析のσ値(ppm)は{1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}, {0.82-0.96(メチル基), 2.33-2.58(第1メチレン基), 1.50-1.70(第2メチレン基), 5.03-5.34(メチン基)}, {2.33-2.58(第1メチレン基), 4.27-4.39(第2メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、3HV、3HPと同定された。この結果を図1に示す。

【0025】(実施例2~5)後段培養における炭素源として1-ペンタノール及び1, 5-ペンタンジオールを表1に示すような混合割合にて調製した以外は実施例1と同様の実施例2~5のポリエステルを得た。

【0026】

【表1】

	実施例										比較例		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3
1-ペンタノール	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	—	—	—	—	5.0	—	—
1,5-ペンタンジオール	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
1,4-ブタンジオール	—	—	—	—	—	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	5.0	—
1,5-ヘキサンジオール	—	—	—	—	—	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—
4-ヒドロキシ酪酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17.0
吉草酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.0

(単位: g)

【0027】(実施例6~10)後段培養における炭素源として1, 4-ブタンジオール及び1, 5-ペンタンジオールを表1に示すような混合割合にて調製した以外は実施例1と同様の実施例6~10のポリエステルを得た。実施例6にて得られたポリエステルは、実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル¹H-NMR(100MHz)及び¹³C-NMR(125MHz)分析に供した。

¹³C-NMR(125MHz)分析は、JEOL GX-100を用いて27°Cにて測定し、CDCl₃ 溶媒、5.5μs パルス幅(45° パルス角度)、パルス繰り返し時間: 5秒、64Kdata pointの条件にて行った。尚、標準試薬としてはTMSを用いた。

【0028】実施例6では¹H-NMR(100MHz)分析のσ値(ppm)が{1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}, {2.33-2.58(第1メチレン基), 1.78-2.09(第2メチレン基), 4.06-4.18(第3メチレン基)}, {2.33-2.58(第1メチレン基), 4.27-4.39(第2メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、4HB、3HPと同定された。この結果を図2に示す。

【0029】また、¹³C-NMR(125MHz)分析のσ値(ppm)172.62から4HB*-4HBが、171.85から4HB*-3HBが、170.04から3HB*-4HBが、169.83から3HP*-3HBが、169.68から3HB*-3HPが、169.14から3HB*-3HBがそれぞれ同定された。この結果を図3に示す。

【0030】(比較例1)後段培養において、炭素源として前記表1に示すように1-ペンタノールのみを5.0g用いた以外は実施例1と同様のポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル¹H-NMR(100MHz)分析に供した。このσ値(ppm)が{1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}, {0.82-0.96(メチル基), 1.50-1.70(第1メチレン基), 2.33-2.58(第2メチレン基), 5.03-5.34(メチン基)}であったことからそれぞれ3HB、3HVと同定された。この結果を図4に示す。

【0031】(比較例2)後段培養において、炭素源として表1に示すように1, 4-ブタンジオールのみを5.0g用いた以外は実施例1と同様のポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロ

トン磁気共鳴スペクトル¹ H-NMR (100MHz)分析に供した。このこのσ値(ppm)が{1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58 (メチレン基), 5.10-5.42 (メチン基)}、{4.06-4.18(第1メチレン基), 1.78-2.09 (第2メチレン基), 2.33-2.58 (第3メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、4HBと同定された。この結果を図5に示す。

【0032】(比較例3) 菌体としてシュードモナス・アシドボランスのかわりにアルカリゲネス・ユートロファスATCC 17699を用い、後段培養の炭素源として表1に示すように4-ヒドロキシ酪酸17g、吉草酸3gを用いた以外は実施例1と同様にポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル¹ H-NMR (100MHz)分析に供した。このσ値(ppm)が{1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58 (メ

*チレン基), 5.10-5.42 (メチン基)}、{0.82-0.96(メチル基), 1.50-1.70(第1メチレン基), 2.33-2.58 (第2メチレン基), 5.03-5.34 (メチン基)}、{4.06-4.18 (第1メチレン基), 1.78-2.09 (第2メチレン基), 2.33-2.58 (第3メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、3HV、4HBと同定された。この結果を図6に示す。

【0033】

【試験例】実施例1~10及び比較例1~3で得られたポリエステルを用いてプロトン磁気共鳴スペクトル¹ H-NMR (100MHz)の積分値から各組成比を計算した。また融点(Tm)をDSC測定により決定した。この結果を表2に示す。

【0034】

【表2】

		実 施 例										比較例		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3
乾燥菌体重量 (g/l)		3.6	3.7	4.1	3.8	3.9	2.8	2.7	3.1	2.8	2.9	4.0	5.3	9.2
共重合体 含有率(%)		5	6	6	3	8	3	5	7	10	4	12	16	44
共 組 成 比 体 モ ル %	3HB	67	48	41	41	36	82	60	34	18	10	32	19	49
	3HV	30	50	58	58	63	0	0	0	0	0	68	0	34
	4HB	0	0	0	0	0	14	36	62	79	86	0	81	17
	3HP	3	2	1	1	1	4	4	4	3	4	0	0	0
融点 (°C)		146	79 140	75 138	81 139	78	125	50	49	54	52	101	51	82 91

【0035】

【発明の効果】以上詳述した如く、この発明はポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すA及びBの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

A. 1-プロパノールまたは1-ペンタノール

B. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法及びポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制

限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール

D. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ペンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法であるから、産業的に利用価値の高い共重合体をも選択的、且つ極めて容易に製造することができるといいう優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1にて得られたポリエステルの¹ H-NMR (100MHz)スペクトル図である。

【図2】実施例6にて得られたポリエステルの¹ H-N

11

MR (100MHz)スペクトル図である。

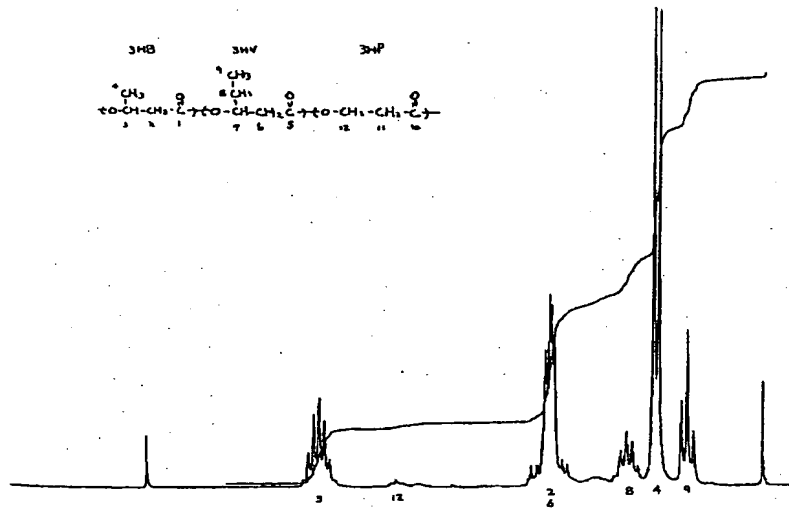
【図3】同上、 ^{13}C -NMR (125 MHz)スペクトル図である。【図4】比較例1にて得られたポリエステル $^1\text{H-N}$ MR (100MHz)スペクトル図である。

*

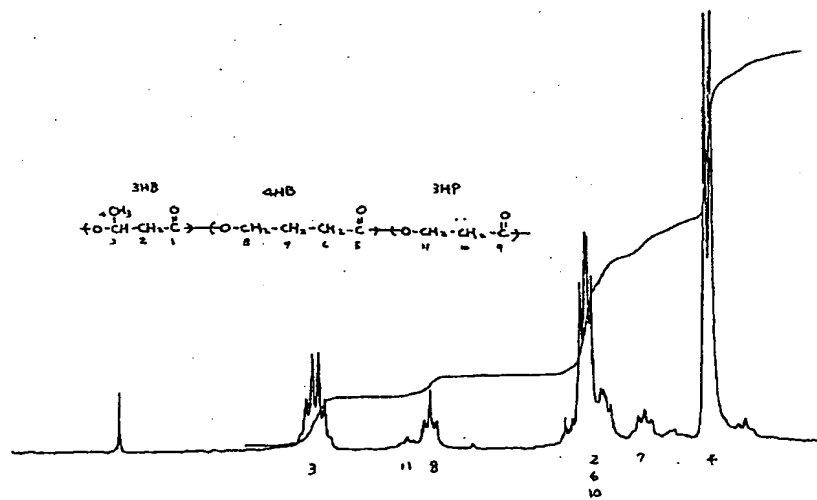
12

*【図5】比較例2にて得られたポリエステル $^1\text{H-N}$ MR (100MHz)スペクトル図である。【図6】比較例3にて得られたポリエステル $^1\text{H-N}$ MR (100MHz)スペクトル図である。

【図1】



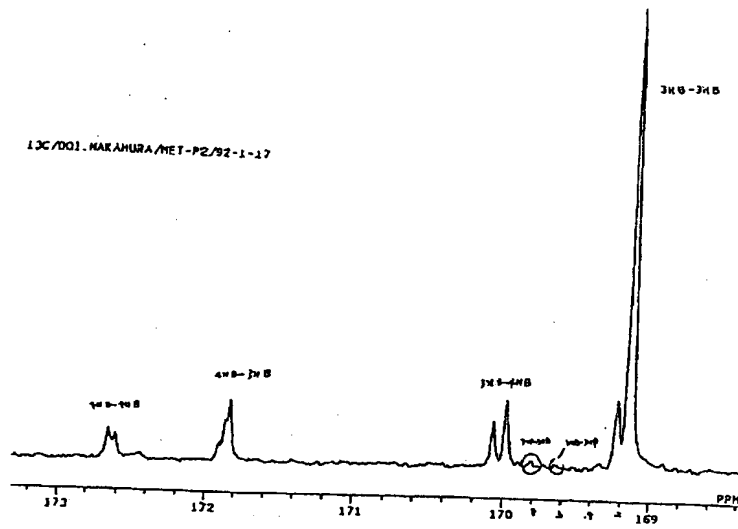
【図2】



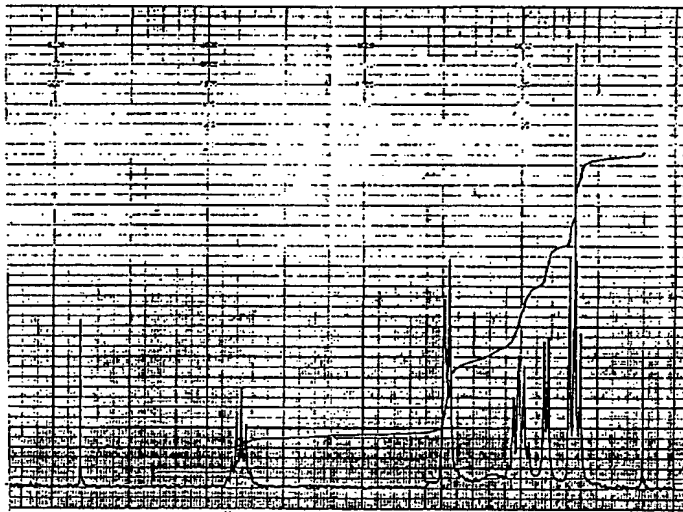
(8)

特開平6-284892

【図3】

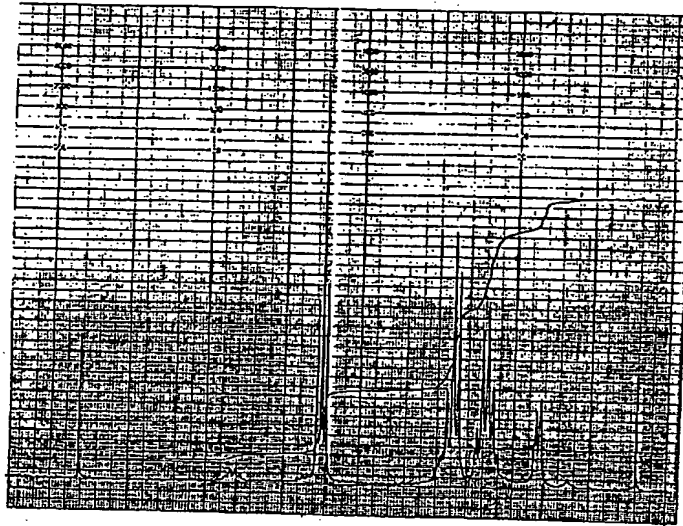


【図4】

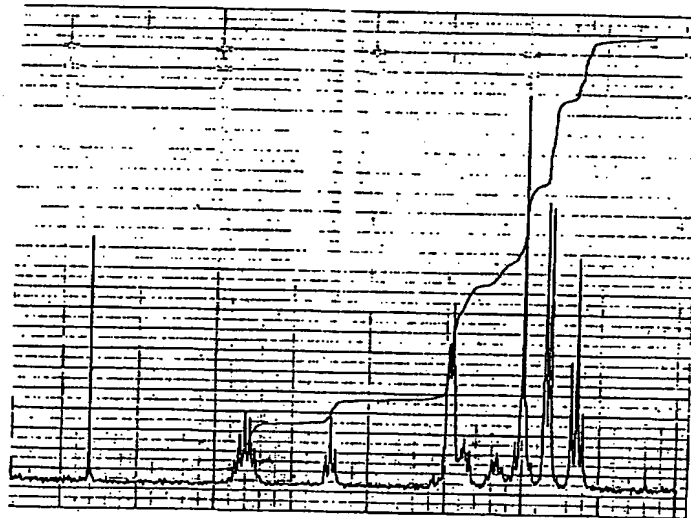


BEST AVAILABLE COPY

【図5】



【図6】



BEST AVAILABLE COPY